

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

**2 378 094**

(A n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction).

**DEMANDE  
DE CERTIFICAT D'ADDITION**

A2

(21)

**N° 77 01889**

Se référant : au brevet d'invention n. 75.34627 du 13 novembre 1975.

(54)

Nouveaux réactifs biologiques constitués par des supports solides sur lesquels sont couplés des composés organiques comportant un résidu glucidique.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.<sup>2</sup>). C 12 K 1/04; G 01 N 33/16.

(22)

Date de dépôt ..... 24 janvier 1977, à 15 h 10 mn.

(33)

(32)

(31)

Priorité revendiquée :

(41)

Date de la mise à la disposition du  
public de la demande .....

B.O.P.I. — «Listes» n. 33 du 18-8-1978.

(71)

Déposant : Etablissement public dit : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE  
LA RECHERCHE MEDICALE - INSERM, résidant en France.

(72)

Invention de : Gérard Quash.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire :

Certificat(s) d'addition antérieur(s) : 1er, n. 76.08966, 2e, n. 76.25898.

La présente Addition est relative à de nouveaux réactifs biologiques constitués par les produits de couplage résultant de la fixation chimique de glycoprotéines biologiquement actives, sur des supports solides, insolubles, porteurs de chaînes latérales  
5 comportant au moins un  $-NH_2$  réactif.

Le Brevet principal a pour objet, en particulier, des réactifs biologiques dont le constituant actif est un produit obtenu par couplage d'un composé organique comportant un résidu glucidique, avec un support solide, insoluble, comportant au moins  
10 un  $-NH_2$  réactif, en particulier au moins un groupement  $-NH_2$  terminal réactif, ce couplage ayant été réalisé par fixation du composé organique par l'intermédiaire de son résidu glucidique dont au moins une fonction alcool primaire a été préalablement modifiée par oxydation en fonction aldéhyde, aux groupement  $-NH_2$  portés  
15 par une chaîne latérale fixée sur ledit support.

Le support solide insoluble sur lequel est fixé chimiquement le composé organique comportant un résidu glucidique, est constitué par un polymère pris dans le groupe qui comprend les latex porteurs de chaînes latérales aliphatiques ou aromatiques  
20 dont le groupement terminal est un groupement  $-NH_2$  ou  $-NH-NH_2$ , lequel support se présente avantageusement sous forme de billes et/ou de microbilles, le polymère étant avantageusement choisi parmi les polystyrènes carboxylés et les polymères de poly(styrène/buta-diène) carboxylés porteurs de chaînes latérales fixées par liaisons  
25 de covalence sur le polymère et avantageusement constituées par une diamine ou une diamine substituée ou par une hydrazine aliphatique ou aromatique, notamment de chaînes latérales d'hexaméthylènediamine et/ou de p-hydrazinobenzoate.

Le composé organique comportant un résidu glucidique  
30 fixé sur un tel support, conformément au Brevet principal, est choisi dans le groupe qui comprend les glycoprotéines, les polysaccharides et les glycolipides, les glycoprotéines étant avantageusement choisies parmi les anticorps, les antigènes, les enzymes et les hormones, comportant un résidu glucidique.

35 Les réactifs biologiques qui font l'objet du Brevet principal sont essentiellement des réactifs biologiques pour le sérodiagnostic d'états pathologiques particuliers, et notamment de diverses maladies virales.

Conformément à la Première Addition, les supports solides  
40 insolubles sont, outre les polymères susdits, également des billes

de gel d'agarose ou de dextrane ou des billes de verre activées, et les chaînes latérales qu'ils portent résultent du couplage sur une amine ou une polyamine, aliphatique ou aromatique, portant un groupement  $-NH_2$  terminal, telle que diamine, polyamine, 5 acide aminé, d'un composé azoté choisi parmi les amines aliphatiques ou aromatiques et/ou les hydrazines aliphatiques ou aromatiques, ou un acide aminé comportant un groupement  $-SH$  et un groupement  $-NH_2$  susceptibles de former un hétérocycle, notamment un dérivé thiazolidine, en présence des fonctions aldéhyde du 10 composé organique fixé sur ledit support.

Conformément à la Deuxième Addition, le composé azoté couplé sur une amine ou une polyamine aliphatique ou aromatique, pour former une chaîne latérale portée par le support solide, est choisi parmi les colorants basiques, permettant ainsi la 15 préparation de réactifs biologiques colorés grâce auxquels il est possible de mettre en évidence des réactions immunologiques (avec des antigènes ou des anticorps en particulier), par réaction directe, notamment dans les réactions d'agglutination, dont la lecture des résultats se trouve ainsi grandement facilitée.

20 Les réactifs de diagnostic obtenus conformément au Brevet principal et aux Première et Deuxième Addition, présentent des qualités de sensibilité, de précision et de stabilité que ne présentent pas les réactifs de diagnostic proposés conformément à l'Art antérieur.

25 La présente Addition a pour objet des réactifs biologiques pour le diagnostic de diverses maladies ou d'états pathologiques particuliers, caractérisés par le couplage d'anticorps spécifiques à l'égard d'antigènes correspondant à des états pathologiques déterminés, lesquels anticorps appartiennent au 30 groupe des glycoprotéines, sur un support solide, insoluble, choisi dans un groupe qui comprend des polymères, en particulier du groupe des latex, des gels de dextrane ou d'agarose, du verre activé, avantageusement sous forme de billes ou de microbilles, lequel support porte des chaînes latérales essentiellement for- 35 mées par fixation par liaisons de covalence, d'amines, de polyamines, de diacides, d'acides aminés, d'hydrazines (aliphatiques ou aromatiques) comportant éventuellement une fonction acide, et éventuellement elles-mêmes couplées au moins par l'intermédiaire de leur  $-NH_2$  réactif, avec un composé azoté choisi parmi les 40 amines aliphatiques ou aromatiques, les hydrazines aliphatiques

ou aromatiques, ou les acides aminés comportant éventuellement conjointement un groupement -SH et un groupement -NH<sub>2</sub> et susceptibles de former un hétérocycle en présence du groupement -CHO de l'anticorps fixé sur ledit support.

5 Conformément à la présente Addition, l'anticorps fixé sur le support substitué susdit, appartient à un groupe qui comprend les virus, les anticorps antigammaglobulines, les gammaglobulines, les hormones comportant un résidu glucidique.

10 Conformément à la présente Addition, l'anticorps fixé est un anticorps marqué au tritium ou au <sup>14</sup>C.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'anticorps fixé choisi parmi les virus, est un virus purifié de la rougeole, de la rubéole, de la maladie de Carré, de la grippe, ou un virus cytomégalytique, oxydés pour comporter au moins une  
15 fonction aldéhyde.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'anticorps choisi parmi les gammaglobulines, est essentiellement constitué par des gammaglobulines anti-produits de dégradation du fibrinogène, oxydées pour comporter au moins une  
20 fonction aldéhyde.

Selon encore un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'anticorps choisi parmi les hormones comportant un résidu glucidique, est essentiellement constitué par de la gonadotrophine chorionique humaine oxydée pour comporter au moins  
25 une fonction aldéhyde.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention vise plus particulièrement les réactifs  
30 biologiques de diagnostic de diverses maladies ou d'états pathologiques particuliers, conformes aux dispositions qui précèdent, ainsi que les moyens propres à la préparation de ces réactifs et les moyens, milieux, tests, etc... mettant ces réactifs en oeuvre pour la réalisation de tests de diagnostic.

35 L'invention pourra être mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui comprend des exemples de préparation des réactifs biologiques conformes à la présente Addition, ainsi que des exemples de mise en oeuvre de ces réactifs dans des tests de diagnostic.

40 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples

sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

#### EXEMPLES

#### I - EXEMPLES DE PREPARATION DE REACTIFS DE DIAGNOSTIC CONFORMES A LA PRESENTE ADDITION

##### EXEMPLE 1 - Préparation d'un réactif de diagnostic "Estapor"-anticorps.

###### A) Préparation du support substitué

La fixation sur les billes de latex d'une chaîne latérale portant des groupements  $-NH_2$  terminaux et la fixation sur cette chaîne d'un acide aminé comportant un groupement  $-SH$ , sont effectuées comme décrit à l'Exemple 2.A. ci-dessous.

###### B) Oxydation chimique des gammaglobulines

A 60 mg d'immunogammaglobulines de cheval en solution dans 2 ml de tampon phosphate 0,1M, pH 6, l'on ajoute 0,2 ml de  $NaIO_4$  0,15M soluble dans l'eau.

Le mélange est laissé à 4°C à l'abri de la lumière pendant 3 heures, au bout desquelles on arrête l'action du  $NaIO_4$  par addition de glycérol à 0,15M final. Après 30 minutes à 4°C, les produits de la réaction sont dialysés pendant 18 heures à 4°C avec plusieurs changements contre du tampon phosphate 0,1M, pH 6.

###### C) Couplage des gammaglobulines oxydées, sur l'"Estapor"-SH obtenu au cours du stade A

A 2 mg d'"Estapor"-SH, on ajoute 1 mg de gammaglobulines oxydées comme décrit au stade B ci-dessus. Après 30 minutes de contact à 4°C, on observe la floculation de particules d'"Estapor"-SH par formation de thiazolidines. Cette floculation ne se produit ni avec l'"Estapor"- $NH_2$ , ni avec l'"Estapor"-SH sur lequel ont été fixées des gammaglobulines non oxydées.

##### EXEMPLE 2 - Préparation d'un réactif de diagnostic de la rougeole constitué par le produit de la réaction d'un support substitué, avec le virus oxydé de la rougeole.

###### A) Préparation du support substitué

a) fixation d'une chaîne latérale portant des groupements  $-NH_2$  terminaux, constituée par une diamine, sur un support insoluble.

A 12 mg d'"Estapor PSI<sub>68</sub>" (marque déposée par RHONE-PROGIL pour désigner un polystyrène carboxy-

lé sphérique et calibré de diamètre de l'ordre de 0,22  $\mu$ ) comportant des groupements -COOH libres, en suspension dans du tampon borate de composition 0,14M NaCl-0,01M borate-HCl, pH 8,1 (BBS), on ajoute 80  $\mu$ moles d'hexaméthylènediamine (HMD). Le mélange est agité à 20°C pendant 3 heures en présence de 0,02M d'1 éthyl 3-(3-diméthylaminopropyl-carbodiimide) chlorhydrate (EDC). Au bout de ce temps, la suspension est dialysée contre le tampon BBS jusqu'à ce que sa D.O. à 230 nm soit égale à zéro. L'on obtient un support en "Estapor" carboxylé-hexaméthylènediamine ("Estapor"-HMD).

b) fixation d'un acide aminé comportant un groupement -SH sur le support d'"Estapor"-HMD obtenu en a). A 2 mg d'"Estapor"-HMD en suspension dans du tampon phosphate pH 6,5, on ajoute 6  $\mu$ moles de cystéine chlorhydrate de formule  $\text{HSCH}_2\text{CH NH}_2\text{COOH}$ , HCl dissoutes dans de l'eau. Le mélange est agité à 20°C pendant 16 heures, en présence de 0,05M d'EDC. Au bout de ce temps, les sphères d'"Estapor" sur lesquelles est fixée la cystéine, sont lavées sur filtre Millipore 0,22  $\mu$  pour éliminer l'excès de cystéine et les produits de la réaction. Les sphères modifiées de la sorte sont remises en suspension dans 2 ml de tampon phosphate pH 6,5.

25 B) Préparation de virus de la rougeole oxydé

A 5 ml d'une préparation antigénique de virus de la rougeole contenant 16 mg de protéine, on a ajouté 0,5 ml de  $\text{NaIO}_4$  0,15M dans du tampon phosphate de sodium 0,1M à pH 6. Ce mélange est laissé à 4°C à l'abri de la lumière pendant 3 heures.

L'on ajoute ensuite 0,5 ml de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0,15M afin d'arrêter l'action du  $\text{NaIO}_4$ .

Après 30 minutes à 4°C, le mélange est dialysé pendant 18 heures à 4°C afin d'éliminer l'excès de produits d'oxydation.

35 C) Couplage du virus de la rougeole oxydé, sur l'"Estapor"-SH

A 20 mg d'"Estapor"-SH obtenu au stade Ab) ci-dessus, en suspension dans du tampon phosphate 0,1M, pH 6,0, on ajoute 10 mg de virus de la rougeole oxydé comme décrit

en B ci-dessus.

Le mélange est soumis à agitation à 4°C, pendant 18 heures. Il est ensuite centrifugé à 6000 g pendant 60 minutes. Le surnageant est recueilli et le culot est lavé à

5

deux reprises par du tampon phosphate, pH 6,0.

Le dosage des protéines subsistant dans le surnageant permet de déterminer qu'il y a 130 µg de protéines virales fixées par mg d'"Estapor"-SH.

10 EXEMPLE 3 - Préparation d'un réactif de diagnostic de la maladie de Carré, constitué par le produit de la réaction d'un support substitué, avec le virus oxydé de la maladie de Carré.

La préparation de ce réactif de diagnostic est effectuée en procédant comme décrit à l'Exemple 2 ci-dessus, le virus de la rougeole étant toutefois remplacé par le virus de la maladie de Carré.

15

EXEMPLE 4 - Préparation d'un réactif de diagnostic sphères de latex-virus de la grippe.

La technique mise en oeuvre pour la préparation de ce réactif est celle décrite à l'Exemple 2 ci-dessus, le virus de la rougeole étant toutefois remplacé par des virus de grippe.

20

EXEMPLE 5 - Préparation d'un réactif de diagnostic sphères de latex-virus de la rubéole.

On utilise, pour préparer ce réactif, la même technique que celle décrite à l'Exemple 2 pour la préparation du réactif de diagnostic de la rougeole, en remplaçant toutefois, le virus de la rougeole par le virus de la rubéole.

25

30 EXEMPLE 6 - Préparation d'un réactif de diagnostic sphères de latex-virus cytomégalique.

L'on utilise, pour préparer ce réactif, la même technique que celle décrite à l'Exemple 2, en remplaçant toutefois le virus de la rougeole par le virus cytomégalique.

EXEMPLE 7 - Préparation d'un réactif de diagnostic "Estapor"-  
gonadotrophine chorionique humaine (GCH)

A) Préparation d'"Estapor" substitué

5 La fixation sur les billes de latex, d'une chaîne latérale portant des  $\text{-NH}_2$  réactifs et la fixation sur cette chaîne d'un acide aminé comportant un groupement  $\text{-SH}$  sont effectuées comme décrit à l'Exemple 2-A. ci-dessus.

10 B) Préparation de la gonadotrophine chorionique humaine oxydée

A 60 mg de GCH en solution dans 2 ml de 0,1M de tampon phosphate pH 6, l'on ajoute 0,2 ml de 0,15M de  $\text{NaIO}_4$  soluble dans l'eau.

15 Le mélange est laissé à 4°C à l'abri de la lumière pendant 3 heures, puis dialysé contre le tampon 0,14M  $\text{NaCl}$ -0,1M  $\text{PO}_4$  pH 6 pendant 1 heure, avec trois changements.

C) Couplage d'"Estapor"-SH à la gonadotrophine chorionique

20 Ce couplage a été réalisé en mettant en oeuvre la technique décrite dans l'Exemple 1.C. ci-dessus.

EXEMPLE 8 - Préparation d'un réactif de diagnostic sphères de latex-SH-gammaglobulines antiproduits de la dégradation du fibrinogène.

25 A) Préparation du support substitué

a) fixation d'une chaîne latérale sur le support

30 A 180 mg de sphères de polystyrène carboxylé DOW 816 (commercialisées par DOW CHEMICAL CORPORATION), on ajoute 560 mg d'hexaméthylènediamine (HMD) dans 20 ml final de 0,14M  $\text{NaCl}$ , 0,01M borate-HCl, pH 8,1. Du 1-éthyl 3-3 diméthylaminopropyl-carbodiimide (EDC) est ajouté à une concentration finale de 0,05M en deux additions successives.

35 Après agitation à 4°C pendant 18 heures, les sphères DOW 816 ont été lavées par trois centrifugations successives à 20 000 g pendant 30 minutes avec le même tampon et suspendues finalement dans 13 ml du tampon phosphate 0,1M pH 6.



- b) Fixation d'un acide aminé comportant un groupement -SH sur le support substitué obtenu en a)

A la suspension de polystyrène carboxylé DOW 816-HMD obtenue en a) ci-dessus, on a ajouté 18 mg de cystéine-HCl dissous dans 2 ml de tampon phosphate 0,1M pH 6, puis de l'EDC à une concentration finale de 0,05M. Après 18 heures à 4°C, les sphères ont été lavées comme décrit en a) ci-dessus.

B) Oxydation chimique des gammaglobulines

A 520 µg de gammaglobulines anti-produits de la dégradation du fibrinogène dans 0,1 ml de BBS, on ajoute 0,1 ml de NaIO<sub>4</sub> 0,03M. Le mélange est laissé à 4°C à l'abri de la lumière pendant 3 heures et est ensuite dialysé contre du BBS pendant 2 heures avec trois changements de tampon.

C) Couplage des gammaglobulines-anti-produits de dégradation du fibrinogène (FDP) oxydées aux sphères de latex DOW-SH

Ce couplage est réalisé en mettant en oeuvre la technique décrite à l'Exemple 1.C ci-dessus, avec cette exception que le rapport protéines oxydées/sphères de latex DOW-SH est de 1 à 20.

Le dosage des protéines restantes dans le surnageant après centrifugation et lavage des sphères de latex DOW couplées, a permis de constater qu'il y a 30 µg de gammaglobulines anti-fibrinogène couplées par mg de sphères de latex DOW.

L'on réalise de la même manière le couplage à des supports en sphères de latex-SH, de gammaglobulines contenant des anticorps polyamines, des gammaglobulines anti IgG humaines, des gammaglobulines anti IgM humaines, des gammaglobulines anti IgG de lapin, des gammaglobulines anti IgG de cobaye, etc...

EXEMPLE 9 - Préparation de réactifs de diagnostic constitués par des sphères de latex substituées sur lesquelles sont fixés chimiquement des anticorps marqués au tritium.

A) Marquage au tritium :

A 1,5 mg de gammaglobulines de chèvre anti-polyamines dans 2 ml de 0,14M NaCl, 0,02M tampon phosphate pH 6, on ajoute 0,65 ml de 0,06M NaIO<sub>4</sub> en solution dans du

tampon phosphate pH 6 (concentration finale de  $\text{NaIO}_4$  : 0,015M).

Le mélange est laissé à 4°C à l'abri de la lumière pendant 3 heures et est ensuite dialysé contre le tampon 0,14M NaCl, 0,02M phosphate pH 6 pendant 1 heure, avec trois changements pour éliminer l'excès de  $\text{NaIO}_4$  (vérification à l'aide de papier amidonné-ioduré). A ce pH, le risque de formation de ponts de Schiff est amoindri entre les groupements -CHO réactifs ainsi formés et les groupements  $-\text{NH}_2$ , soit de la lysine, soit de groupements N terminaux des protéines.

Le contenu du sac à dialyse est ensuite transféré dans un tube.

Un excès de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  cristallin (100 mCi/mMol) en provenance de New England Nuclear est alors ajouté, suivi d'1 ml de tampon 0,1M borate-HCl pH 8,8 (ce changement de pH favorise la réduction des groupements -CHO en  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ).

Après un temps de contact de 16 heures à 4°C, sous une hotte bien ventilée, le contenu du tube est transféré dans un sac à dialyse et dialysé jusqu'à ce que le liquide de dialyse soit exempt de toute radioactivité. L'on obtient ainsi un marquage pour les anticorps anti-polyamines de 670 c.p.m. par  $\mu\text{g}$  de protéines.

Il est également possible d'augmenter l'activité spécifique des anticorps en procédant de la façon suivante : à 1,5 mg de gammaglobulines oxydées, on ajoute 20  $\mu\text{Ci}$  d'éthanolamine  $^3\text{H}$  (3,8 Ci/mMol) à pH 8,8 ; les ponts de Schiff ainsi formés sont ensuite stabilisés par réduction à l'aide de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  (5 mCi) pendant 18 heures à 4°C. L'excès de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  est éliminé par dialyse. Ceci a permis d'obtenir des gammaglobulines anti-polyamines ayant une activité spécifique de 1807 c.p.m./ $\mu\text{g}$ .

B) Couplage d'un support insoluble comportant des chaînes latérales portant au moins un  $-\text{NH}_2$  réactif aux groupements -CHO des gammaglobulines oxydées et stabilisation des ponts de Schiff par réduction au  $\text{NaB}^3\text{H}_4$

La technique mise en oeuvre est celle décrite à l'Exem-

ple 1.C ci-dessus.

L'on obtient ainsi des réactifs dont la stabilité est très longue, qui n'émettent pas de rayonnement gamma (contrairement aux procédés connus qui réalisent le marquage par iodination des groupements tyrosine sur la chaîne protéique, à l'aide d'iode radioactif) et dont l'activité biologique est inaltérée.

EXEMPLE 10 - Préparation de réactifs de diagnostic constitués par des sphères de latex substituées sur lesquelles sont fixés chimiquement des anticorps marqués au  $^{14}\text{C}$ .

L'on obtient des réactifs portant des anticorps marqués au  $^{14}\text{C}$  en procédant comme décrit à l'Exemple 9, à l'exception du fait que l'on utilise, pour le marquage isotopique des anticorps, de l'éthanolamine  $^{14}\text{C}$ , et que l'on procède à la réduction à l'aide de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$ .

II - TESTS VISANT A DEMONTRER L'EFFICACITE DES IMMUNO-REACTIFS CONFORMES A LA PRESENTE ADDITION.

La réaction antigène-anticorps est effectuée dans les conditions de température, durée de contact, etc... les plus appropriées à chaque cas particulier. La réaction positive se manifeste par l'agglutination des billes ou sphères. La lecture des résultats se fait en estimant l'agglutination soit simplement par macroagglutination, soit par microagglutinations sur plaques alvéolaires. Il est possible de quantifier la réaction par une lecture néphélométrique directe ou en séparant les complexes formés soit par filtration, soit par centrifugation et lecture de la densité optique des sphères de latex restantes, ou par mesure de la radioactivité dans le cas de latex marqués présents sur les filtres ou dans le culot.

A) Tests par macroagglutination sur plaques de verre

EXEMPLE 11 - Test d'activité agglutinante d'"Estapor"-SH-virus de la rougeole oxydé

Les dilutions d'antisérum ont été effectuées dans le tampon suivant : 1 % sérum albumine bovine,

0,14M NaCl ; 0,01M Tris-HCl, pH 8,2.

Le réactif latex-virus de la rougeole conforme à l'invention a été utilisé, dans ce test, à raison de 4  $\mu\text{g/ml}$ .

Les résultats obtenus par macroagglutination du réactif

conforme à l'invention sur plaques de verre sont illustrés à la figure 1 dans laquelle le résultat obtenu avec le témoin [sérum de lapin anti-VSV (VSV = Vesicular Stomatitis Virus)] se trouve dans la partie gauche de la figure, et le résultat obtenu avec le sérum de lapin anti-rougeole se trouve dans la partie droite de la figure.

**EXEMPLE 12 - Test d'activité agglutinante d'"Estapor"-SH-virus de la maladie de Carré oxydé**

Ce réactif a été testé dans les conditions rapportées à l'Exemple 11 ci-dessus.

Des résultats similaires ont été obtenus en présence de sérum de lapin anti-VSV comme témoin, et de sérum de lapin anti-virus de la maladie de Carré comme essai.

**EXEMPLE 13 - Test d'activité agglutinante d'"Estapor"-GCH par macroagglutination sur plaque**

Résultats : la réaction est positive avec un sérum de lapin anti-GCH dilué jusqu'à 1/160. A cette dilution l'inhibition de la réaction a été obtenue avec l'urine de la femme enceinte.

**EXEMPLE 14 - Test d'activité agglutinante du réactif sphères de latex DOW-antifibrinogène par macroagglutination sur plaques**

Les sphères de DOW anti-FDP ont été mises en suspension dans le tampon suivant : 1 % sérum albumine bovine, 0,14M NaCl, 0,1M Tris-HCl pH 8,2, 0,0015M azide de soude, à raison de 8 mg/ml.

La réaction est positive avec le fibrinogène humain jusqu'à 4 µg/ml, ainsi que cela ressort de la figure 2 annexée, et avec le sérum humain dilué à 1/10.

**EXEMPLE 15 - Dosage de polyamines dans l'urine par macroagglutination sur plaques de verre**

Des billes d'"Estapor"-polyamine préparées comme décrit à l'Exemple 2.A ci-dessus, à l'exception du fait que l'HMD est remplacée par la spermine, sont mises en suspension dans un tampon contenant 1 % de sérum d'albumine bovine, 0,14M NaCl, 0,1M Tris, pH 8,3, 0,0015M d'azide de sodium, à raison de 4 mg de latex/ml, puis substituées par des gammaglobulines contenant des anticorps antipolyamines, oxydées.

Une agglutination positive a été obtenue avec le sérum

de chèvre antipolyamines dilué au 1/30ème dans ce même tampon ; la réaction négative a été obtenue avec ce même sérum de chèvre, avant immunisation.

Dans ces conditions, la réaction positive a été inhibée par l'urine de la femme enceinte.

B) Tests par microagglutination sur plaques alvéolaires

EXEMPLE 16 - Test de l'activité de microagglutination de l'"Estapor"-SH-virus de la rougeole oxydé

Les résultats obtenus sont illustrés à la figure 3 des dessins annexés, à partir de réactifs obtenus conformément à l'Exemple 2 ci-dessus.

Les dilutions d'antisérum ont été effectuées dans le tampon suivant : 0,14M NaCl, 0,01M borate-HCl, pH 8,1.

A : Sérum de lapin J anti-rougeole préparé sur cellules Véro ;

B : Sérum de lapin M anti-rougeole préparé sur cellules Véro ;

C : Sérum de lapin C anti-VSV (VSV = Vesicular Stomatitis Virus) utilisé comme témoin.

La dilution du sérum est la suivante :

Rangée 1 : 1/10	Rangée 5 : 1/160	Rangée 9 : 1/2560
- 2 : 1/20	- 6 : 1/320	- 10 : 1/5120
- 3 : 1/40	- 7 : 1/640	- 11 : 1/10240
- 4 : 1/80	- 8 : 1/1280	

La rangée 12 ne contient que du tampon.

Le réactif latex-virus de la rougeole conforme à l'invention a été utilisé à raison de 675 µg/ml.

La réaction est positive de A<sub>1</sub> à A<sub>6</sub> et négative de A<sub>7</sub> à A<sub>12</sub>.

La réaction est positive de B<sub>1</sub> à B<sub>5</sub> et négative de B<sub>6</sub> à B<sub>12</sub>. La réaction est négative de C<sub>1</sub> à C<sub>12</sub>.

Il ressort du test illustré à la figure 3 que les trois témoins A<sub>12</sub>, B<sub>12</sub>, C<sub>12</sub> sont négatifs et qu'il n'y a pas de réaction non spécifique avec le sérum C.

La sensibilité de la réaction a été augmentée en soumettant les sphères de latex-virus de la rougeole conformes à l'invention à un traitement préalable au tritium X-100 à 1 % : avec ce latex-rougeole tritié, la réaction négative avec le sérum J ne commence qu'à A<sub>10</sub> et avec le sérum M à B<sub>6</sub>. La réaction avec le sérum C est totalement

- 5 négative. Cette spécificité de réaction a été contrôlée par des essais avec latex-Véro (c'est-à-dire un extrait de cellules Véro utilisées pour préparer le virus de la rougeole, et couplé au latex dans les conditions décrites à l'Exemple 2.C. ci-dessus. On n'a observé aucune réaction entre le réactif latex-Véro et les sérums J, M et C, ce qui permet de conclure que la réaction avec le réactif latex-rougeole conforme à l'invention est spécifique et d'une très grande sensibilité.
- 10 La quantification de la réaction de diagnostic peut également être réalisée par lecture néphélométrique directe, par lecture de la densité optique ou par mesure de la radioactivité de latex marqués, comme décrit au Brevet principal.
- 15 Il résulte de ce qui précède que, quels que soient les modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application adoptés, l'on obtient des réactifs biologiques de diagnostic de divers états pathologiques et maladies, qui présentent une excellente stabilité et une très grande sensibilité.
- 20 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, la présente Addition ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien
- 25 en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente Addition, et elle s'étend en particulier à d'autres systèmes anticorps-antigènes que ceux qui ont été décrits à titre d'exemples non limitatifs, dans ce qui précède.

REVENDEICATIONS

1° - Réactifs biologiques pour le diagnostic de diverses maladies ou d'états pathologiques particuliers, selon le Brevet principal, caractérisés par le couplage d'anticorps spécifiques à l'égard d'antigènes correspondant à des états pathologiques déterminés, lesquels anticorps appartiennent au groupe des glycoprotéines, sur un support insoluble choisi dans un groupe qui comprend des polymères, en particulier du groupe des latex, des gels de dextrane ou d'agarose, du verre activé, avantageusement sous forme de billes et/ou de microbilles, lequel support porte des chaînes latérales essentiellement formées par fixation par liaisons de covalence, d'amines, de polyamines, de diacides, d'acides aminés, d'hydrazines (aliphatiques ou aromatiques) comportant éventuellement une fonction acide et éventuellement elles-mêmes couplées au moins par l'intermédiaire de leur  $-NH_2$  réactif, avec un composé azoté choisi parmi les amines aliphatiques ou aromatiques, les hydrazines aliphatiques ou aromatiques, ou les acides aminés, comportant éventuellement conjointement un groupement  $-SH$  et un groupement  $-NH_2$  et susceptibles de former un hétérocycle en présence de la fonction aldéhyde de l'anticorps fixé sur ledit support.

2° - Réactifs biologiques selon la Revendication 1, caractérisés en ce que l'anticorps fixé sur le support substitué susdit, appartient à un groupe qui comprend les virus, les anticorps antigammaglobulines, les gammaglobulines, les hormones comportant un résidu glucidique.

3° - Réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 ou 2, caractérisés en ce que l'anticorps fixé est un anticorps marqué au tritium ou au  $^{14}C$ .

4° - Réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisés en ce que l'anticorps fixé est constitué par le virus de la rougeole oxydé pour comporter au moins une fonction aldéhyde.

5° - Réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisés en ce que l'anticorps fixé est constitué par le virus de la rubéole oxydé pour comporter au moins une fonction aldéhyde.

6° - Réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisés en ce que l'anticorps fixé est

constitué par des virus de grippe oxydés pour comporter au moins une fonction aldéhyde.

7° - Réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisés en ce que l'anticorps fixé est  
5 constitué par le virus cytomégalique oxydé pour comporter au moins une fonction aldéhyde.

8° - Réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisés en ce que l'anticorps fixé est  
10 constitué par le virus de la maladie de Carré oxydé pour comporter au moins une fonction aldéhyde.

9° - Réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisés en ce que l'anticorps est constitué par des gammaglobulines anti-produits de dégradation du fibrinogène oxydés pour comporter au moins une fonction aldéhyde.

10° - Réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisés en ce que l'anticorps est constitué par de la gonadotrophine chorionique humaine oxydée pour  
15 comporter au moins une fonction aldéhyde.

11° - Réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 à 10, caractérisés en ce qu'ils sont constitués  
20 par un réactif polystyrène-diamine-cystéine-anticorps.

12° - Réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 à 10, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par un réactif polystyrène-polyamine-anticorps.

13° - Réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 à 10, caractérisés en ce qu'ils sont constitués  
25 par un réactif polystyrène-diamine-anticorps.

14° - Procédé de couplage de glycoprotéines, et plus généralement de composés organiques comportant un résidu glucidique, sur un support solide  
30 insoluble, pour obtenir les réactifs biologiques selon l'une quelconque des Revendications 1 à 13, dans lequel au moins une fonction alcool non réactive du résidu glucidique du composé organique, est oxydée en fonction aldéhyde, à l'aide de périodate de sodium, lequel procédé est caractérisé en ce que la réaction d'oxydation est réalisée à pH 6 environ, l'excès d'agent oxydant étant éliminé à la fin de la réaction d'oxydation susdite, par tous moyens appropriés,  
35 tels que notamment, dialyse, filtration, centrifugation ou addition d'un réactif chimique capable d'être oxydé par ledit agent oxydant, à pH 6 environ, la stabilisation des bases de Schiff formées étant réalisée par addition de  $\text{NaBH}_4$  et en maintenant des conditions de pH de l'ordre de 8,8.



Fig. 1

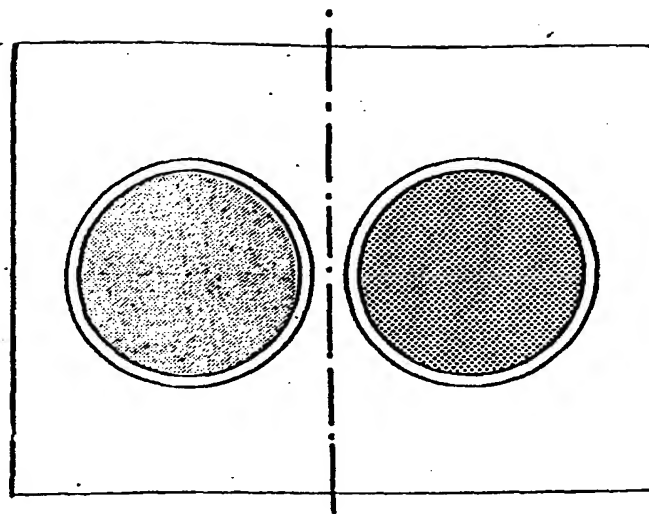


Fig. 2

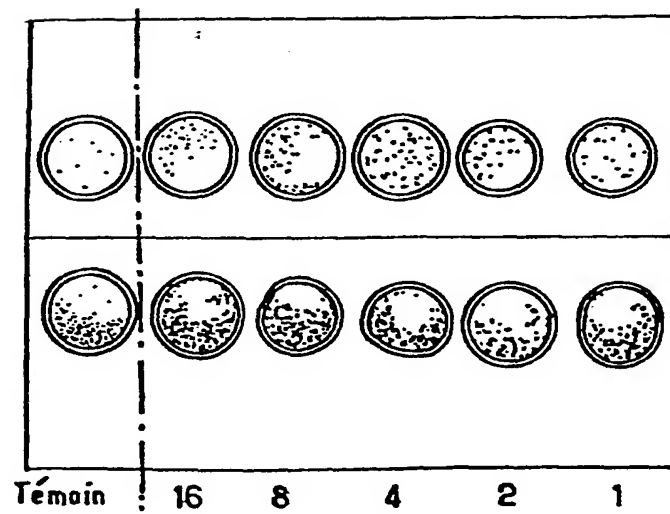


Fig. 3

